

## RINGKASAN

### IDENTIFIKASI BAHAN AKTIF ANTIMALARIA DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN *Alectryon serratus* TERHADAP *Plasmodium falciparum* IN VITRO

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi dengan prevalensi yang cukup tinggi, terutama di negara-negara yang sedang berkembang. Berdasarkan data dari WHO, pada tahun 2015 terdapat hampir 200 juta kasus malaria, dengan angka kematian mencapai 627 ribu jiwa. Penanggulangan malaria hingga saat ini masih menghadapi beberapa kendala, salah satunya adalah munculnya galur parasit yang resisten terhadap obat antimalaria. Oleh karena itu, upaya untuk menemukan obat antimalaria baru baik dari bahan alam maupun semisintesis merupakan prioritas utama program penanggulangan malaria.

Salah satu upaya untuk menemukan obat antimalaria baru adalah dengan melakukan skrining aktivitas antimalaria terhadap beberapa tanaman. Pada penelitian pendahulu, hasil skrining dari 20 tanaman yang diperoleh dari hutan Alas Purwo, Banyuwangi menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *A.serratus* aktif sebagai antimalaria dengan  $IC_{50}$  12,22  $\mu\text{g/mL}$ . Kemudian fraksi etil asetat dari daun *A.serratus* juga menunjukkan aktivitas antimalaria dengan  $IC_{50}$  9,45  $\mu\text{g/mL}$  (pada uji *in vitro*), dan  $ED_{50}$  5,92  $\mu\text{g/mL}$  (pada uji *in vivo*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bahan aktif antimalaria dari fraksi etil asetat daun *A.serratus* dengan konsep *bioactivity guided isolation*.

Pemisahan fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan fase diam ODS. Dari hasil pemisahan didapatkan 12 subfraksi, yang disebut sebagai EA.1- EA.12. Profil kromatogram KLT menunjukkan adanya senyawa golongan polifenol, dan flavonoid. Uji aktivitas antimalaria dilakukan pada subfraksi EA.1- EA.12. Pada tahap pertama dilakukan skrining pada konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$ . Subfraksi yang memiliki nilai persen hambatan  $> 50\%$ , dilakukan pengujian  $IC_{50}$  pada lima konsentrasi, yaitu 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,001  $\mu\text{g/mL}$ . Dari hasil skrining didapatkan empat subfraksi dengan persen hambatan  $> 50\%$ , yaitu subfraksi EA.4 (60,70%); EA.8 (82,36%); EA.9 (79,89%) dan EA.11 (77,04%). Dari keempat subfraksi tersebut didapatkan masing-masing  $IC_{50}$  yaitu EA.4 (0,035  $\mu\text{g/mL}$ ); EA.8 (0,187  $\mu\text{g/mL}$ ); EA.9 (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ); EA.11 (0,017  $\mu\text{g/mL}$ ). Berdasarkan hasil tersebut, maka subfraksi EA.4; EA.8; EA.9 dan EA.11 aktif sebagai antimalaria.

EA.2.1 diperoleh sebagai serbuk putih dari subfraksi EA.2. Hasil identifikasi dari subfraksi EA.2.1 dengan menggunakan KLT menunjukkan adanya spot pada  $R_f$  0,75 yang berpendar hitam pada panjang gelombang 254 nm

dan 366 nm. Identifikasi menggunakan KCKT didapatkan waktu retensi 4,333 dengan spektrum UV 266 nm. Hasil identifikasi dengan spektrofotometer RMI-<sup>1</sup>H didapatkan adanya sinyal pada  $\delta$  7.02 (2H,s) dan dari profil RMI-<sup>13</sup>C terdapat 5 posisi karbon yang berbeda. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut, maka EA.2.1 adalah senyawa asam 3,4,5- trihidroksi benzoat atau asam galat.

Pemisahan terhadap subfraksi EA.4 dilakukan dengan KLT preparatif dan diperoleh 2 subfraksi, yaitu EA.4.1 dan EA.4.2. EA.4.2 diperoleh sebagai serbuk kekuningan. Hasil KLT menunjukkan EA.4.2 memiliki Rf 0,6 dengan spot berpendar kehitaman pada  $\lambda$  254 nm dan 366 nm. Hasil identifikasi dengan KCKT menunjukkan adanya puncak pada Rt 4,544, dengan puncak spektrum UV pada  $\lambda$  271 nm. Data RMI-<sup>1</sup>H menunjukkan adanya sinyal pada  $\delta$  7.07 (2H,s) yang merupakan proton dari senyawa aromatis dan sinyal pada  $\delta$  3.75 (3H,s) yang merupakan sinyal dari gugus metoksi (OCH<sub>3</sub>). Data RMI-<sup>13</sup>C menunjukkan adanya 6 posisi atom karbon yang berbeda. berdasarkan data tersebut, maka senyawa EA.4.2 adalah metil galat.

Proses pemisahan selanjutnya dilakukan pada subfraksi EA.6; EA.7 dan EA.8 dengan target spot pada Rf 0,48. Ketiga subfraksi digabung dan disebut dengan EAM1. KLT preparatif dilakukan dengan fase diam silika dan fase gerak kloroform-metanol 8-2. Dari hasil KLT preparatif didapatkan tiga senyawa, yaitu EAM1.1 (4,9 mg); EAM1.2 (5 mg); dan EAM1.3 (2,1 mg). Hasil identifikasi dengan KLT menunjukkan bahwa spot EAM1.3 pada Rf 0,3 sudah murni untuk dilakukan identifikasi selanjutnya. Spot dari ketiga hasil KLT preparatif berpendar kehitaman pada panjang gelombang 254 dan 366 nm, serta berwarna kuning ketika dengan penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%.

EAM1.3 diperoleh berupa serbuk kuning. Data RMI-<sup>1</sup>H menunjukkan adanya sinyal pada  $\delta$  7.83 (1H,dd,J=48,4) yang merupakan sinyal dari proton gugus aromatik pada posisi C-2' dan C-6'. Keduanya berada pada posisi yang simetris. Sinyal pada  $\delta$  6.99 (1H,dd,J=8,4) merupakan sinyal dari proton pada posisi C-3' dan C-5'. Kedua sinyal tersebut menunjukkan posisi orto dari proton pada posisi C-2', 6' dan C-3', 5' (Sovia *et al.*, 2013). Sinyal pada posisi  $\delta$  6.45 (1H, d, J= 2,4 Hz) dan  $\delta$  6.24 (1H,d, J= 1,6 Hz) adalah geseran kimia proton pada posisi atom karbon C-6 dan C-8. Nilai J menunjukkan bahwa kedua proton pada atom karbon C-6 dan C-8 berada pada posisi meta (Sovia *et al.*, 2013). Sinyal pada 12.69 merupakan proton dari gugus hidroksil (OH) pada posisi C-5. Data dari RMI-<sup>13</sup>C menunjukkan adanya sinyal oksiaril pada  $\delta$  170.3, 164.4, 159.7, 163.8 dan 156.6. Sinyal pada  $\delta$  178.5 yang merupakan ciri khas dari karbon keton C=O pada posisi C-4. Sinyal pada  $\delta$  70-71 merupakan karbon dari gugus gula. Profil HMBC dan HMQC menunjukkan bahwa EAM1.3 adalah senyawa glikosida kaempferol, dengan gugus gula ramnosil terletak pada atom karbon C-3. Berdasarkan data dari RMI-<sup>1</sup>H dan RMI-<sup>13</sup>C, maka EAM1.3 adalah senyawa kaempferol-3-O-ramnosil.

KLT preparatif dilakukan pada subfraksi EA.10 dan EA.11 untuk mendapatkan spot pada posisi Rf 0,2. Dari hasil KLT preparatif EA.10 dan EA.11. didapatkan masing-masing 4 subfraksi, yaitu EA.10.1-EA.10.4 dan EA.11.1- EA.11.4. Untuk mengetahui kemurnian dari EA.10.1 dan EA.11.1 maka dilakukan pengukuran terhadap profil kromatogram KCKT. Dari hasil KCKT diketahui bahwa subfraksi EA.10.1 dan EA.11.1 belum murni, hal ini ditunjukkan dengan adanya 2 puncak dominan pada Rt 12,615 dan Rt 13,674. Kedua puncak tersebut memiliki serapan UV maksimal pada panjang gelombang 266 nm, 324 nm dan 342 nm. Selanjutnya puncak pada Rt 12,615 disebut sebagai EA.10.1.1 dan puncak pada Rt 13,674 disebut sebagai EA.11.1.1

KCKT semipreparatif dilakukan pada subfraksi EA.10.1 dan EA.11.1 menggunakan fase diam *shimpack* RP-18 dan fase gerak asetonitril-air 6-4 dengan kecepatan alir 1,5 ml/menit. Dari hasil pemisahan tersebut didapatkan total EA.10.1.1 sebanyak 3,1 mg dan EA.11.1.1 sebanyak 3,8 mg. Profil KCKT menunjukkan bahwa senyawa EA.10.1.1 dan EA.11.1.1 belum murni, hal ini ditunjukkan dengan adanya satu puncak dominan pada Rt 12,799 dan Rt 13,938.

KCKT semipreparatif tahap kedua dilakukan dengan menggabung sampel EA.10.1.1 dan EA.11.1.1 yang selanjutnya disebut sebagai EAM2. Dari hasil pemisahan tersebut didapatkan EAM2.1 sebanyak 1 mg dan *crude isolate* EAM2.2 sebanyak 0,5 mg.

Uji aktivitas anti-malaria dilakukan terhadap EA.2.1; EA.4.2; EAM.1.3 dan EAM2.1. Dari hasil uji diketahui EA.2.1 memiliki nilai  $IC_{50}$  0,013  $\mu$ g/mL dan EAM2.1 memiliki nilai  $IC_{50}$  0,097  $\mu$ g/mL. Berdasarkan hasil tersebut, maka EA.2.1 dan EAM2.1 aktif sebagai antimalaria.

## IDENTIFICATION OF ANTIMALARIAL ACTIVE SUBSTANCE FROM ETHYL ACETATE FRACTION OF *Alectryon serratus* LEAVES.

Malaria was one of the public health concern due to the development of resistance by the most lethal causative species, *Plasmodium falciparum*. Screening of in vitro antimalarial from several Indonesian plants showed that ethyl acetate fraction of *Alectryon serratus* was active as anti-malarial based on Chinchilla criteria ( $IC_{50}$  9,45  $\mu\text{g/mL}$ ). The aim of this study is to identify antimalarial active substances from ethyl acetate fraction of *A.serratus* leaves. Open column chromatography using ODS as the stationary phase have been carried out and 12 subfractions were obtained and named as EA.1-EA.12. The in vitro antimalarial activity assay was done using *Plasmodium falciparum* 3D7 culture and Giemsa staining method. The result showed that fraction EA.4; EA.8; EA.9 and EA.11 were active as antimalarial with  $IC_{50}$  0,035  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,187  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,015  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,017  $\mu\text{g/mL}$ . The known compound gallic acid and methyl gallate were isolated from EA.2 and EA.4. Kempferol-3-O-rhamnoside was isolated from EAM1. Flavonoid was identified from EAM2.1. Gallic acid was active as antimalarial with  $IC_{50}$  0,013  $\mu\text{g/mL}$ . EAM2.1 was also active as antimalarial with  $IC_{50}$  0,097  $\mu\text{g/mL}$ . From the result, we conclude that fraction EA.4; EA.8; EA.9; EA.11; gallic acid and flavonoid compound isolated from ethyl acetate fraction of *Alectryon serratus* leaves exhibited in vitro antimalarial activity and potential to be developed as a new antimalarial drug.

Keywords : antimalarial, *Alectryon serratus*, in vitro, flavonoid, polyphenol